





دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری حرفه ای رشته‌ی دامپزشکی

تعیین گونه و مشخصات باکتریولوژیک استافیلوکوکوس‌های جدا شده  
از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در منطقه شهرکرد

استاد راهنما:

دکتر ناصر شمس اسفند آبادی

استاد مشاور:

دکتر عزیزالله ابراهیمی

پژوهشگر:

فاطمه سلیمانی

دی ماه ۱۳۹۱



دانشکده دامپزشکی  
گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه خانم فاطمه سلیمانی جهت اخذ درجه دکتری دامپزشکی با عنوان تعیین گونه و مشخصات باکتریولوژیک استافیلوکوکوس‌های جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در شهرکرد در تاریخ ۱۳۹۱/۱۰/۲۷ با حضور هیئت داوران زیر بررسی و با رتبه/نمره مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استاد راهنمای پایان نامه دکتر ناصر شمس اسفندآبادی با مرتبه علمی دانشیار امضاء
۲. استاد مشاور پایان نامه دکتر عزیزالله ابراهیمی با مرتبه علمی استادیار امضاء
۳. استاد داور داخلی گروه دکتر ابوالفضل شیرازی با مرتبه علمی دانشیار امضاء
۴. استاد داور خارجی گروه دکتر افشین جعفری دهکردی با مرتبه علمی استادیار امضاء

مسئولیت کلیه عقاید و نظراتی که در این پایان نامه آورده شده است به عهده نگارنده بوده و دانشکده دامپزشکی هیچ مسئولیتی را در این زمینه تقبل نمی‌نماید.

دکتر حسین نورانی  
رییس دانشکده دامپزشکی

دکتر سعید حبیبیان دهکردی  
معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی  
دانشکده دامپزشکی

تقدیم بہ:

آنان کہ ہر لحظہ دعائشان را احساس می کنم

پدر و مادر عزیزم؛

بہ پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمہ ایثار و از خودگذشتگی

و بہ پاس محبت ہامی بی دریغشان کہ مرکز فروکش نمی کند

و

برادران و خواہر عزیزم، بہترین دوستان زندگیم

صیانه قدردانی می کنم از زحمت:

جناب آقای دکتر شمس که در نهایت صبر و سکون در تمام مراحل این پایان نامه مروری نمودند

جناب آقای دکتر ابراهیمی که همیشه راهها و راهکهای من بودند بدون راهنمایی های ارزنده ایشان انجام این کار میسر نبود.

جناب آقای دکتر حسینی و دکتر شیرازی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند و مراد تصحیح آن

یاری نمودند

از ناظر محترم جلسه جناب آقای دکتر شاتانی تشکر میکنم.

و همه اساتید بزرگوار دوران تحصیل

سکار خانم لطفعلیان که در انجام این پایان نامه مروری کردند

کاکلن کلینیک دانشکده دامپزشکی

و

همسران دوران تحصیل، آنان که خاطرات شیرین و فراموش نشدنی را در ذهنم ماندگار ساختند.

کلیه حقوق مادی حاصله از نتایج مطالعات، ابتکارات  
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه  
متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

## چکیده:

ورم پستان التهاب غده پستانی بدون در نظر گرفتن عامل مولد آن است. پاتوژن‌های زیادی باعث ایجاد ورم پستان می‌شوند، اما گونه‌های استافیلوکوکوس اغلب اوقات به عنوان عامل عفونت‌های داخل پستانی در نشخوارکنندگان کوچک شناخته می‌شوند. بررسی حاضر با هدف تعیین گونه و برخی مشخصات باکتریولوژیک استافیلوکوکوس‌های جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی در شهرکرد انجام شد. در یک بررسی اولیه، ۶۰۰ رأس گوسفند شیروار از ۱۸ گله در شهرکرد به طور تصادفی انتخاب شده و به روش CMT از لحاظ ابتلا به ورم پستان تحت بالینی بررسی شدند. ۷۰ مورد ورم پستان تحت بالینی شناسایی شد. ۵۵ مورد جدایه‌های مختلف استافیلوکوکوس جدا شد که ۳۳ مورد (۶۰٪) استافیلوکوکوس اورئوس و ۲۲ (۴۰٪) مورد استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی بودند. ۲۶ جدایه (۷۸/۷٪) از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و ۱۳ جدایه (۵۹/۹٪) از استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی بیوفیلیم تولید کردند. ۲ جدایه (۶/۰۶٪) از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس همولیزین آلفا، ۲ جدایه (۶/۰۶٪) همولیزین بتا و ۶ جدایه (۱۸/۲٪) هم همولیزین دلتا تولید کردند. از استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی ۶ مورد (۲۷/۲۷٪) همولیزین آلفا و ۱۰ مورد (۴۵/۴۵٪) همولیزین دلتا تولید کردند. ۱۶ جدایه از جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و ۵ جدایه از استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی آنزیم بتالاکتاماز تولید کردند. استافیلوکوکوس اورئوس حساسیت کمی نسبت به متی سیلین، اریترومایسین و استرپتومایسین نشان داد، در حالی که استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی حساسیت کمی را نسبت به متی سیلین و استرپتومایسین نشان دادند. در نهایت درصد بالای تولید همولیز، بیوفیلیم و بتالاکتاماز توسط جدایه‌های استافیلوکوکوس نقش مهم این فاکتورها را در بیماری‌زایی این جدایه‌ها از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان نشان می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** گوسفند، ورم پستان، استافیلوکوکوس، بیوفیلیم، بتالاکتاماز، همولیزین، آنتی بیوگرام، ایران

۴	فصل اول - مقدمه
۶	فصل دوم - کلیات
۶	۱-۲- ساختار غده پستان در گوسفند
۶	۲-۲- ورم پستان
۷	۱-۲-۲- تقسیم بندی ورم پستان
۷	۱-۱-۲-۲- ورم پستان تحت بالینی
۷	۲-۱-۲-۲- ورم پستان بالینی
۸	۲-۲-۲- معاینه فیزیکی پستان
۹	۲-۳-۲- روش های موجود در تشخیص ورم پستان
۹	۱-۳-۲-۲- روش کولز (Coles)
۱۰	۲-۲-۳-۲- روش براملی (Bramley)
۱۱	۳-۳-۲-۲- روش چائوهان (Chauhan)
۱۱	۴-۲-۲- عوامل ایجادکننده ورم پستان
۱۱	۱-۴-۲-۲- پاتوژن های اصلی
۱۲	۲-۴-۲-۲- پاتوژن های غیر اصلی
۱۲	۳-۴-۲-۲- پاتوژن های غیر معمول
۱۲	۵-۲-۲- ورم پستان در میش
۱۳	۱-۵-۲-۲- ورم پستان استافیلوکوکوسی
۱۵	۲-۵-۲-۲- ورم پستان استرپتوکوکوسی
۱۷	۳-۵-۲-۲- ورم پستان ناشی از گونه های منهمیا
۱۸	۴-۵-۲-۲- ورم پستان کلستریدیایی
۱۸	۵-۵-۲-۲- ورم پستان سودوموناسی
۱۸	۶-۵-۲-۲- کلینیکال پاتولوژی
۱۹	۷-۵-۲-۲- درمان ورم پستان در میش
۱۹	۸-۵-۲-۲- کنترل
۱۹	۳-۲- استافیلوکوکوس ها
۱۹	۱-۳-۲- خصوصیات مرفولوژی و بیوشیمیایی
۲۰	۱-۱-۳-۲- شکل و خصوصیات ظاهری
۲۰	۲-۱-۳-۲- خصوصیات کشت و واکنش های بیوشیمیایی
۲۱	۳-۱-۳-۲- مقاومت باکتری نسبت به عوامل مختلف
۲۱	۴-۱-۳-۲- تشخیص آزمایشگاهی استافیلوکوکوس ها
۲۲	۵-۱-۳-۲- محیط های کشت تشخیصی و آزمایشگاهی استافیلوکوکوس ها
۲۳	۶-۱-۳-۲- تست های تشخیصی استافیلوکوکوس بیماری زا



۲۳	۲-۳-۲- عوامل مهم بیماری‌زایی استافیلوکوکوس‌ها
۲۳	۱-۲-۳-۲- پادگن‌های استافیلوکوکوس‌ها
۲۴	۲-۲-۳-۲- عامل جمع‌کنندگی یا کوآگولاز متصل
۲۴	۳-۲-۳-۲- توکسین‌ها
۲۶	۴-۲-۳-۲- آنزیم‌های مترشحه از استافیلوکوکوس‌ها
۲۷	۵-۲-۳-۲- تولید بیوفیلم
۲۷	۳-۳-۲- طرز ایجاد بیماری

۲۸	<b>فصل سوم- مواد و روش کار</b>
۲۸	۱-۳- جمع‌آوری نمونه
۲۸	۱-۱-۳- انجام آزمایش CMT
۲۹	۲-۳- جداسازی باکتری
۲۹	۱-۲-۳- انجام آزمایش کاتالاز
۲۹	۲-۲-۳- شناسایی گونه‌ها
۳۰	۱-۲-۲-۳- آزمایش کوآگولاز
۳۰	۲-۲-۲-۳- تست تخمیر قند مانیتول
۳۱	۲-۲-۲-۳- تعیین نوع همولیز
۳۱	۴-۲-۲-۳- آزمایش تولید بیوفیلم
۳۳	۵-۲-۲-۳- آزمایش تولید بتالاکتاماز
۳۳	۶-۲-۲-۳- آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی (آنتی‌بیوگرام)
۳۴	۷-۲-۲-۳- تحلیل داده‌ها

۳۵	<b>فصل چهارم- نتایج</b>
----	-------------------------

۳۸	<b>فصل پنجم- بحث</b>
----	----------------------

۴۳	<b>منابع</b>
----	--------------

## فهرست جدول‌ها

شماره صفحه	عنوان
۸	جدول شماره ۱-۲: تقسیم بندی ورم پستان
۲۲	جدول شماره ۲-۲: خصوصیات برخی گونه‌های استافیلوکوکوس
۳۶	جدول شماره ۱-۴: پاسخ استافیلوکوکوس‌های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک‌ها
۳۷	جدول شماره ۲-۴: الگوی تشکیل بیوفیلم، همولیز و بتالاکتاماز در استافیلوکوکوس‌های جدا شده

## فصل اول

### مقدمه:

آماس پستان (mastitis)، التهاب غده پستانی است که عمده ترین علت این بیماری باکتری‌ها هستند، البته میکروارگانسیم‌های دیگر نیز در ایجاد آن نقش دارند.

عمده ترین باکتری‌های ایجادکننده آن استافیلوکوکوس اورئوس (*staphylococcus aureus*)، استرپتوکوکوس آگلالتیه (*streptococcus agalactiae*) و استرپتوکوکوس اوبریس (*streptococcus uberis*) هستند. ورم پستان یکی از پیچیده‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های غده پستان محسوب می‌شود [۲۵]. در ورم پستان تحت بالینی علائم بالینی مشاهده نمی‌شود ولی عوامل پاتوژن در شیر وجود دارند و باعث کاهش تولید شیر و تغییر در وضعیت ترکیبات شیمیایی شیر و ضرر و زیان اقتصادی می‌شود [۲۳،۲۹،۳۹،۴۸،۵۹]. همچنین با توجه به فعال شدن برخی آنزیم‌ها تأثیرات به سزایی در محصولاتی نظیر پنیر، کره و خامه به وجود آمده و باعث کاهش کیفیت این محصولات می‌شود.

استافیلوکوکوس‌ها پاتوژن غالب در ورم پستان‌های تحت بالینی و مزمن هستند که در این میان گونه استافیلوکوکوس اورئوس از بقیه معمول‌تر است [۴۷]، البته در سال‌های اخیر نقش استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی (*Couagulase Negative Staphylococcus (CNS)*) در ایجاد ورم پستان برجسته‌تر شده است. این باکتری‌ها چندین توکسین و آنزیم تولید می‌کنند که در بیماری‌زایی و حدت آن‌ها مؤثر هستند از جمله: لوکوسیدین (*Leukocidin*)، لیپاز (*Lipase*)، همولیزین (*Hemolysin*)، پروتئاز (*Proteas*) و DNase [۳۰،۳۲،۴۷].

سایر عوامل پاتوژن از قبیل استرپتوکوکوس، انتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*)، زودوموناس انروژیناس (*Pseudomonas aeroginas*)، منهمیا همولیتیکا (*Manhemia hemolytica*)، کورینه باکتريا (*Corynebacteria*) و عوامل قارچی هم می‌توانند باعث ایجاد عفونت‌های داخل پستانی در نشخوارکنندگان کوچک شوند [۲۳].

تولید همولیزین از بیشترین موضوعاتی است که در رابطه با استافیلوکوکوس‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. استافیلوکوکوس اورئوس سه نوع همولیزین آلفا، بتا و گاما تولید می‌کند و چهارمین نوع همولیزین هم در سال

۱۹۸۳ توسط Price و Smith شناسایی و کشف شد [۳۷]. امروزه بسیاری از گونه‌های استافیلوکوکوس نسبت به برخی آنتی بیوتیک‌ها مقاومت پیدا کرده‌اند [۳۰, ۳۲, ۵۳]، که همین امر باعث شکست در درمان و کنترل این میکروارگانیسم‌ها می‌شود، پس باید حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی آن‌ها را به درستی مشخص و تعیین کرد، کنترل ورم پستان در حیوانات شیری با کمک درک درست پاتوژن‌های درگیر و منبع عفونت امکان پذیر است [۴۷].

سؤالی که در اینجا مطرح است این است که آیا استافیلوکوکوس‌های جدا شده از موارد ورم پستان تحت بالینی در گوسفند از نظر گونه و مشخصات باکتریولوژیک تفاوت دارند یا خیر؟ هدف این مطالعه تعیین گونه و مشخصات باکتریولوژیک استافیلوکوکوس‌های جدا شده از شیر گوسفندان مبتلا به ورم پستان تحت بالینی است.

## فصل دوم

### کلیات:

#### ۲-۱- ساختار غده پستان در گوسفند

پستان در گوسفند به صورت دو غده کنار هم در ناحیه مغابنی قرار دارد، هر یک از این غده‌ها به طور کامل جدا از هم هستند و حتی سیستم گردش خون مجزایی دارند. منشأ غده پستانی از اکتودرم (Ectoderm) است. اکثر تکامل بافت پستانی در دوره جنینی در نیمه اول آبستنی رخ می‌دهد. بعد از شروع بلوغ، پستان بعد از هر سیکل فعلی رشد و تکامل بیشتری می‌یابد. هورمون استروژن که پس از بلوغ با رشد فولیکول‌ها در بدن تولید می‌شود، قادر است رشد مجاری غدد پستانی را افزایش دهد و هورمون پروژسترون که توسط جسم زرد دوره‌های فعلی و یا توسط جفت در دوران آبستنی ساخته می‌شود، قادر است تکثیر و رشد غدد ترشحاتی را افزایش دهد. بافت اسفنجی که نقش ترشحاتی دارد از میلیون‌ها ساختار حبابچه مانند (Alveolus) تشکیل شده است که توسط مجرای به فضای جمع آوری کننده شیر (Cistern) تخلیه می‌شوند. سطح داخلی آلوئول‌ها توسط یک لایه از یاخته‌های اپیتلیال ترشحاتی پوشیده شده است.

پیش سازهای اجرایی تشکیل‌دهنده شیر از مویرگ‌های مجاور توسط این سلول‌های اپیتلیال به آلوئول‌ها جذب می‌شود و به پروتئین، شیر، لاکتوز، چربی و سایر ترکیبات تبدیل می‌شود که در فاصله بین دو دوشش داخل حفره یا آلوئول‌های داخلی آزاد شده و ذخیره می‌شوند. اطراف آلوئول‌ها را شبکه‌ای از سلول‌های ماهیچه ای صاف تحت عنوان میوآپیتلیال (Myoepithelial) یا سلول‌های سبدی (Basket cells) می‌پوشاند که با انقباض خود موجب فشرده شدن آلوئول‌ها و تخلیه شیر آن در زمان شیردوشی می‌شوند. نوع ترشح در غدد پستانی از نوع آپوکرین است که در آن قسمتی از دیواره سلول ماده ترشحاتی را می‌پوشاند [۷، ۱۱].

#### ۲-۲- ورم پستان:

ورم پستان التهاب غده پستان بدون در نظر گرفتن عامل مولد آن است که به وسیله طیفی از تغییرات فیزیولوژیک، شیمیایی و عموماً "باکتریایی در شیر و همچنین تغییرات پاتولوژیک در بافت غده پستان مشخص می‌شود. تغییرات مهم در شیر عبارتند از تغییر رنگ، حضور لخته در شیر و وجود تعداد زیادی از

لوکوسیت‌ها در آن، علاوه بر این تورم، درد، ادم و گرما در غدد شیری ایجاد می‌شود. با توجه به اینکه شمار زیادی از ورم پستان‌ها با ملامسه دستی یا با مشاهده شیر هنگام دوشش قابل شناسایی نیستند، پس می‌توان گفت تعداد زیادی از رخدادهای ورم پستان به صورت تحت بالینی می‌باشد، پس تشخیص ورم پستان به طور عمده وابسته به تست‌های غیر مستقیم نظیر شمارش سلول‌های سوماتیک یا SCC (Somatic Cell Count) و سنجش الکترولیت‌های موجود در شیر (سدیم و کلر) می‌باشد. به نظر می‌رسد که کاربردی‌ترین و متداول‌ترین روش برای تشخیص ورم پستان به عنوان یک بیماری، افزایش مشخص SCC در شیر غده مبتلا می‌باشد که تقریباً در همه موارد افزایش SCC در شیر ناشی از افزایش غلظت نوتروفیل‌ها در پاسخ به آسیب به بافت غده ای پستان است و ادامه این روند منجر به تغییرات ظاهری در شیر می‌شود [۶۳، ۶۱، ۱۰، ۷].

## ۲-۲-۱- تقسیم بندی ورم پستان:

التهاب پستان تقریباً همیشه عفونی بوده و بر اساس حضور یا عدم حضور نشانه‌های بالینی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شود:

الف) ورم پستان بالینی

ب) ورم پستان تحت بالینی [۲۷، ۲۴]

## ۲-۱-۲- ورم پستان تحت بالینی:

ظاهر وضعیت پستان و ترشح شیر در ورم پستان تحت بالینی طبیعی است و کارتیبه در مشاهده و ملامسه قوام طبیعی دارد و حیوان سالم است، اما عامل بیماری‌زا حضور فعال دارد و میزان ماده خشک آن کاهش و میزان لوکوسیت‌های موجود در آن افزایش می‌یابد، از این رو بیشتر خسارات ناشی از ورم پستان به ورم پستان تحت بالینی نسبت داده می‌شود [۳۸].

اغلب موارد ورم پستان‌های تحت بالینی بوسیله ارگانیسیم‌های واگیردار نظیر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* یا بوسیله ارگانیسیم‌های محیطی از جمله گونه‌های مختلف *استرپتوکوکوس* غیر از *آگالاکتیه* مانند *استرپتوکوکوس اوبریس* یا *استرپتوکوکوس دیس‌گالاکتیه* (*Streptococcus dysgalactiae*) ایجاد می‌شود [۳۴، ۲۵].

آزمایش‌های تشخیصی این نوع ورم پستان آزمایش ورم پستان کالیفرنیا یا (California Mastitis CMT Test)، شمارش سلول‌های سوماتیک و کشت میکروبی شیر می‌باشد.

## ۲-۱-۲- ورم پستان بالینی:

ورم پستان بالینی را بر اساس وضعیت دام مبتلا و شدت علائم به سه دسته تقسیم می‌کنند: الف) ورم پستان درجه یک: در این فرم بیماری معمولاً در ابتدای دوشش لخته‌های کمی دیده می‌شود ولی در بقیه دوشش شیر طبیعی است و پستان طبیعی به نظر می‌رسد، علاوه بر این تعدادی نوتروفیل و پاتوژن هم در شیر دیده می‌شود، اما در هر حال کارتیبه طبیعی احساس می‌شود و دام مریض نیست. معمولاً هم توسط استافیلوکوکوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها ایجاد می‌شود.

ب) ورم پستان درجه دو: در این فرم تغییرات قابل مشاهده‌ای در شیر و کارتیه دیده می‌شود ولی واکنش عمومی در دام مشاهده نمی‌شود و دام مریض نیست که خود دو نوع حاد و مزمن است: اگر کارتیه مبتلا متورم، دردناک، گرم و گاهی همراه با تغییر رنگ (سرخ شدن) باشد درجه دو حاد نامیده می‌شود.

در نوع مزمن علائم مربوط به فاز حاد از بین رفته و به همین دلیل گرم و دردناک نیست، اما به دلیل بافت همبندی (فیبروبلاست و فیبروسیت و تولید کلاژن) کارتیه مبتلا سخت، توده‌ای و بدون درد است که این نوع در نهایت به آتروفی پستان منجر می‌شود.

ج) ورم پستان درجه سه: این شکل از ورم پستان تمام مشخصات شکل حاد را دارد و علاوه بر آن واکنش عمومی نیز در دام مشاهده می‌شود [۱۱،۳۵]. در جدول شماره ۲-۱ به طور خلاصه به انواع ورم پستان اشاره شده است.

جدول شماره ۲-۱: تقسیم بندی ورم پستان

وضعیت دام	وضعیت پستان	وضعیت شیر	تعداد سلول‌ها	تعداد پاتوزن‌ها	
-	-	-	-	-	طبیعی
-	-	-	+	+	فرم تحت بالینی
-	-	+	+	+	درجه ۱
-	+	+	+	+	درجه ۲
+	+	+	+	+	درجه ۳

- غیر طبیعی  
+ طبیعی

## ۲-۲-۲- معاینه فیزیکی پستان:

مشاهده و لمس کردن موارد غیر طبیعی پستان و کارتیه‌ها یکی از روش‌های کاربردی تشخیص ورم پستان است. بهترین زمان جهت لمس پستان برای معاینه فیزیکی بلافاصله بعد از دوشش است که پستان خالی از شیر شده است، البته مشاهده پستان در حالت پر و خالی هر دو مفید است. در حالت نرمال دو طرف پستان قرینه است. ابتدا دو نیمه پستان را مشاهده کرده، با هم مقایسه می‌کنیم، تصمیم درباره اینکه کدامیک از نیمه‌های پستان غیر طبیعی است احتیاج به ملامسه و مقایسه با قسمت مجاور خود دارد. تمام قسمت‌های نیمه پستان باید لمس شود، همچنین سر پستانک‌ها و غدد لنفاوی فوق پستانی باید لمس شوند و از نظر جراحات و صدمات وارده به نوک پستان و وجود توده‌های غیر طبیعی در نوک پستان مورد معاینه قرار گیرند. مشاهده تورم در یک نیمه و یا شیر شبیه سرور و یا دیگر تغییرات احتمالی در شیر راهنمای مناسبی در یافتن

ورم پستان و درمان آن است. ملامسه و بازرسی پستان در جهت شناسائی وجود فیبروز، تورم التهابی و آتروفی بافت پستانی باید دنبال شود. بافت فیبروزه در اثر ازدیاد بافت همبند ایجاد شده و لذا قسمت مبتلا سخت تر از قسمت مقابل می گردد و در ملامسه سطح آن دارای گره های بیشتری است. وجود آماس، تورم، گرما، درد و غیر طبیعی بودن ترشح نشانگر التهاب حاد پستان است، در حالی که آتروفی پستان و تغییر شکل و چروکیده شدن آن بیانگر مراحل انتهایی ورم پستان مزمن است [۴۲،۴۶].

### ۲-۲-۳- روش های موجود در تشخیص ورم پستان:

ورم پستان بالینی به دلیل وجود علائم بالینی خارجی (متورم شدن، غیرطبیعی بودن شیر و یا بروز علائم بالینی) به راحتی قابل تشخیص است، اما اغلب اوقات ورم پستان به صورت تحت بالینی بروز می کند که در این حالت ظاهر شیر و پستان سالم است و برای تشخیص آن از تست های مختلفی می توان استفاده کرد. روش هایی که به منظور تشخیص و شناسایی اورام پستان به کار می روند، در منابع گوناگون به صورت زیر دسته بندی شده اند:

### ۲-۳-۱- روش کولز (Coles):

کولز تست های آزمایشگاهی تشخیصی ورم پستان را به چند دسته تقسیم می کند:

الف) روش های شیمیایی (Chemical methods)

ب) روش های میکروسکوپی (Microscopic methods)

ج) کشت دادن (Culture)

روش های شیمیایی به عنوان آزمایش های غیرمستقیم مطرح هستند و شامل: تعیین pH، تست بروموتیمول آبی (Bromothymol Blue)، تست بروموکرزول ارغوانی (Bromocresol Purple)، تست کلراید (Chloride test)، تست وایت ساید (White side test)، تست ورم پستان کالیفرنایی می باشد. روش های میکروسکوپی شامل شمارش مستقیم لوکوسیت ها می باشد.

روش کشت دادن نیز همان کشت نمونه شیر بر روی محیط های مختلفی می باشد که بیشتر برای تعیین نوع باکتری مولد ورم پستان بالینی یا غیر بالینی استفاده می شود و به تنهایی برای اثبات ورم پستان به کار نمی رود.

❖ نحوه انجام و تفسیر آزمایش CMT به عنوان یک تست معمول برای تشخیص ورم پستان تحت بالینی:

در حال حاضر CMT معتبرترین آزمایشی است که در دامداری ها و با هزینه مناسب انجام می شود و برای جست و جوی ورم پستان تحت بالینی استفاده می شود [۶۱].

اساس آزمایش CMT بر پایه شمارش لوکوسیت ها می باشد، به این ترتیب که در موقع ورم پستان تعداد این سلول ها افزایش می یابد، این تغییر در شیر به علت وجود آگزوداهای التهابی در آئول های پستان و مخلوط شدن با شیر و در نتیجه قلیایی شدن شیر رخ می دهد. این آزمایش روش ساده ای است که برای مشخص کردن ورم پستان تحت بالینی بر اساس تخمین تعداد سلول های شیر استفاده می شود. آزمایش CMT تعداد سلول ها را مشخص نمی کند و تنها بالا یا پایین بودن تعداد سلول های شیر را نشان می دهد.



برای انجام آزمایش شیر اولیه هر کارتیبه را دور ریخته و ۲-۳ میلی لیتر شیر به درون فنجانک مخصوص ریخته و سپس هم حجم آن، معرف CMT اضافه می شود و در ادامه معرف و شیر را با حرکت چرخشی در سطح افق مخلوط می نمایند. حداکثر تا ۲۰ ثانیه باید نتیجه را قرائت کرد و بر مبنای وضعیت ژل تشکیل شده درجه بندی صورت می گیرد.

دو معرف شیمیایی در این آزمایش استفاده شده است یکی از آنها یک دترژنت آنیونیک (Anionic detergent) است به نام آلکیل آریل سولفونات (Alquil aril sulfonate) ۳ درصد که در pH=۷ یا کمی بالاتر بهترین حساسیت را دارد که سلول های موجود در شیر را لیزه کرده و با اسیدهای نوکلئیک هسته سلول های سوماتیک ترکیب شده و به دنبال واکنش انجام شده رسوب یا ژلی تولید می گردد. علاوه بر معرف اصلی آلکیل آریل معرف کمکی تعیین pH به نام بروموکرزول نیز در محلول CMT وجود دارد. از آنجا که در ورم پستان pH از حالت نرمال (حدود ۶/۶) افزایش می یابد (۶/۸ یا بیشتر) رنگ این محلول (ارغوانی یا آبی) تغییر می کند.

بر اساس وضعیت ژل تشکیل شده نتیجه آزمایش CMT به روش زیر تفسیر می شود:  
اگر رسوب ناچیزی تشکیل شود و سریعاً محو شود حالت خنثی یا Trace ایجاد شده است که در اثر وجود ۴۰۰۰۰۰ سلول به وجود می آید.

اگر ژلی تشکیل شود، حالت ۱+ ایجاد شده است که در اثر وجود ۱,۰۰۰,۰۰۰-۵۰۰,۰۰۰ سلول به وجود می آید.

اگر ژل غلیظ تشکیل شود، حالت ۲+ ایجاد شده است که در اثر وجود ۲,۰۰۰,۰۰۰-۱,۰۰۰,۰۰۰ سلول به وجود می آید.

اگر ژل چسبناک و نخی شکل باشد، حالت ۳+ ایجاد شده است که در اثر وجود ۴,۰۰۰,۰۰۰-۲,۰۰۰,۰۰۰ سلول به وجود می آید.

که به صورت منفی (N)، جزئی (T)، ۱+، ۲+، ۳+ درجه بندی می گردد [۶,۸,۱۳,۱۹,۴۶].  
در استفاده از CMT برای به حداقل رسانیدن منفی کاذب (حداکثر حساسیت)، نتایج آزمایش باید فقط به صورت منفی یا مثبت (شامل موارد خفیف تا ۳ مثبت) قرائت شود ولی برای به حداقل رسانیدن مثبت کاذب (حداکثر ویژگی)، نتایج باید به صورت منفی (شامل منفی و خفیف) و مثبت (۱ تا ۳ مثبت) قرائت شود.  
در ایران از محلول شیرآزما استفاده می شود.

## ۲-۲-۳-۲- روش براملی (Bramley):

براملی استفاده از ردیاب های ورم پستان را که در طول لوله های شیردوشی قرار می گیرند و نیز استفاده از تجهیزات شیردوشی مجهز به سنسور را در جهت تشخیص ورم پستان های بالینی توصیه می کند و روش های تشخیص فرم تحت بالینی را به صورت زیر می داند:

الف) تست های باکتریولوژیکی (Bacteriological)

ب) تست های سایتولوژیکی (Cytological)

ج) تست های بیوشیمیایی (Biochemical)

تست های باکتریولوژیکی همان روش کشت دادن نمونه ها است.

تست‌های سایتولوژیکی، تست‌های اندازه‌گیری کننده سلول‌های درون شیر است که شامل شمارش میکروسکوپی یا استفاده از ابزار الکترونیکی، روش CMT است. تست‌های بیوشیمیایی نیز عبارتند از: هدایت الکتریکی، اندازه‌گیری غلظت لاکتوز، تست کاتالاز، تست N-استیل D-β گلوکز آمینیداز، اندازه‌گیری آنتی تریپسین و آلبومین سرم گاوی می‌باشد [۱۵].

#### ۲-۳-۲- روش چائوهان (Chauhan):

الف) تست‌های فیزیکی شامل بررسی رنگ، بو، pH، قوام، وزن مخصوص، استریپ کاپ (Strip cup) (ب) تست‌های شیمیایی شامل برموتیمول آبی، تست کلراید، CMT و هایتنس (Hotis) (ج) تست‌های سایتولوژیکی که شمارش میکروسکوپی سلول‌های شیر است. (د) تست‌های باکتریولوژیکی که شامل آزمایش مستقیم میکروسکوپی و آزمایش کشت نمونه است [۸، ۱۸].

#### ۲-۲-۴- عوامل ایجاد کننده ورم پستان:

عوامل بسیاری در ایجاد ورم پستان نقش دارند، در منابع مختلف بالغ بر ۲۰۰ عامل موثر در ایجاد ورم پستان ذکر شده است. بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی این عوامل در سه دسته قرار می‌گیرند [۱۳، ۶۱].

الف) پاتوژن‌های اصلی

ب) پاتوژن‌های غیر اصلی

ج) پاتوژن‌های غیر معمول

#### ۲-۴-۱- پاتوژن‌های اصلی

عواملی هستند که منجر به ایجاد ورم پستان بالینی می‌گردند و خود به دو دسته تقسیم می‌شوند:

##### الف) پاتوژن‌های واگیردار

مخزن اصلی این عوامل کارتیه‌های آلوده می‌باشند و عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها در حین شیردوشی و از طریق وسایل شیردوشی، دست‌های فرد شیردوش، بره‌های شیرخوار و از کارتیه‌های آلوده به کارتیه‌های سالم و از حیوانی به حیوان دیگر انتقال می‌یابند. از جمله پاتوژن‌های این گروه می‌توان استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، و مایکوپلاسما بوویس (*Mycoplasma bovis*) را نام برد که باعث ایجاد ورم پستان واگیردار می‌شوند [۶۱].

##### ب) پاتوژن‌های محیطی

منشا عوامل محیطی، محیط اطراف دام از قبیل بستر، کود، خاک، آب آلوده و مگس‌ها می‌باشند. این عوامل بیشتر در فواصل بین دو شیردوشی از محیط دام وارد سرپستانک‌ها و غدد پستانی شده و ایجاد عفونت می‌کنند، از جمله پاتوژن‌های این گروه می‌توان: گونه‌های استرپتوکوکوس مانند استرپتوکوکوس اوبریس و استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه که بیشترین شیوع را دارند و استرپتوکوکوس اکوئینوس (*S. equinus*) که شیوع کمتری دارد، کلی‌فرم‌های محیطی شامل اشرشیا کلی (*Eshrichia coli*)، کلبسیلا (*Klebsiella*)، گونه-

های سیتروباکتر (*Citrobacter*)، گونه‌های انتروباکتر (*Enterobacter*)، گونه‌های زودوموناس و سایر اجرام گرم منفی مانند پروتئوس (*Proteus*) را نام برد [۶۱،۶۲،۱۱].

#### ۲-۲-۴-۲- پاتوژن‌های غیر اصلی

این پاتوژن‌ها جز فلور طبیعی سرپستانک‌ها و غدد پستانی هستند و معمولاً تنها در نوک سرپستانک مجرای پستان قرار می‌گیرند و به علت آسیب‌زایی پایین‌شان از اهمیت کمتری در ایجاد اورام پستان برخوردارند و بنابراین مشکل است که بتوان آن‌ها را عامل ایجاد ورم پستان بالینی دانست. در شرایط خاصی این باکتری‌ها ممکن است سبب افزایش تعداد سلول‌ها و بروز عفونت تحت بالینی در پستان شوند. این عوامل شامل گونه‌های استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی و اغلب غیرهمولیتیک مانند استافیلوکوکوس *zailuosus* (*Staphylococcus xylosum*)، استافیلوکوکوس اینترمدیکوس (*Staphylococcus intermedicus*)، استافیلوکوکوس هایکوس (*Staphylococcus hyicus*) و استافیلوکوکوس اپیدرمیس (*Staphylococcus epidermidis*) می‌باشند [۶۱،۶۲].

#### ۲-۲-۴-۳- پاتوژن‌های غیر معمول

گروه دیگری از عوامل ایجادکننده ورم پستان می‌باشند که قراردادن آن‌ها در گروه‌های قبلی مشکل است. اگر چه احتمال بروز ورم پستان در اثر عفونت این تعداد وسیع وجود دارد، ولی بیشتر ورم پستان‌ها به علت چند عامل متداول ذکر شده رخ می‌دهد. ورم پستان‌های ایجاد شده در اثر این عوامل معمولاً "تک گیر هستند و تنها یک یا تعداد کمی از دام‌های یک گله را درگیر می‌کنند. برخی پاتوژن‌های این گروه عبارتند از: آرکانوباکتر پایوژنز (*Arcanobacter pyogenese*)، گونه‌های نوکاردیا (*Nocardia*)، گونه‌های پاستورلا (*Pasteurella*)، استرپتوکوکوس فکالیس (*Streptococcus fecalis*)، استرپتوکوکوس زواپیدرمیکوس (*S. zooepidermicus*)، سالمونلا (*Salmonella*) و قارچ‌ها و مخمرها [۶۱].

#### ۲-۲-۵- ورم پستان در میش:

بیشتر موارد ورم پستان کلینیکی (۹۰-۸۰٪) در اثر استافیلوکوکوس اورئوس به وجود می‌آیند و سایر موارد در اثر استرپتوکوکوس اگالاکتیه، منهمیا همولیتیکا و به میزان کمتری اشیریشیا کلی و هیستوفیلوس اویس (*Hystophilus ovis*) به وجود می‌آید. استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی دلیل عمده ورم پستان غیرکلینیکی در گوسفند می‌باشند. علاوه بر گاو شیری، میش نگهداری شده در چراگاه تنها گونه‌ای است که در آن شیوع ورم پستان ناشی از استافیلوکوکوس و منهمیا همولیتیکا رخ می‌دهد. درصد کمی از موارد توسط کلستریدیوم پرفرینجنس تیپ آ (*Clostridium perfringense A*)، گونه‌های زودوموناس و کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس (*Corynebacterium psedotuberculosis*) ایجاد می‌شوند. آکوله پلاسما (*Acholeplasma*) در میش بیماری‌زا است و می‌تواند ورم پستان ایجاد کند. مایکوپلاسما سروتیپ دو (*Mycoplasma serogroup 2*) زمانی که به طور آزمایشی تلقیح شود در گوسفند بیماری‌زا است [۶۱].

## اپیدمیولوژی:

ورم پستان کلینیکی در میش‌ها بلافاصله بعد از گرفتن بره‌ها از شیر یا نزدیک به زمان زایمان رخ می‌دهد. در میش‌های چراگاهی شیوع کم است و به طور معمول به دلیل گونه‌های منهمیا همولیتیکا یا استافیلوکوکوس می‌باشد. در میش‌های نگه‌داری شده در جایگاه خیلی از موارد به دلیل جراحی سرپستانک رخ می‌دهد، به ویژه زمانی که میش روی بستر خشن از قبیل ورق‌های فلزی قرار می‌گیرد.

بیش از ۱۰ درصد میش‌های دوشا ورم پستان غیرکلینیکی دارند. ورم پستان کلینیکی در میش‌های چراگاهی تنها در حدود ۲ درصد در سال است، ولی ورم پستان باعث مرگ بیش از ۱۰ درصد میش‌های مبتلا می‌گردد. زبان‌ها در میش شیری مانند گاو شیری است. در میش‌های گوشتی و پشمی زبان‌ها در اثر مرگ مبتلایان ایجاد می‌شود که به طور معمول ناشی از ورم پستان قانقاریایی و کاهش رشد در نوزاد است. در شرایطی که بره‌های شیر خوار به غذای تکمیلی دسترسی یافته‌اند اثر ورم پستان غیرکلینیکی روی بره ناچیز است [۶۱].

## ۲-۵-۱- ورم پستان استافیلوکوکوسی:

شایع‌ترین پاتوژن ورم پستان در میش استافیلوکوکوس / اورئوس می‌باشد. وقوع ورم پستان کلینیکی ممکن است ۲۰ درصد باشد میزان مرگ و میر از ۲۵ تا ۵۰ درصد متفاوت است. پستان مبتلا در میش‌هایی که خطر را گذرانده‌اند به طور معمول از بین می‌رود. ورم پستان مزمن می‌تواند منجر به ۲۵-۳۰ درصد کاهش در تولید شیر نیمه پستان مبتلا شود. بیماری در کشورهایی که شیر میش‌ها ماده اصلی غذایی است خیلی مهم است. بیماری احتمالاً از بستر عفونی و از طریق جراحی سرپستانک که توسط بره‌های شیرخوار ایجاد شده منتقل می‌شود.

نوع دیگر ورم پستان استافیلوکوکوسی در میش‌ها ناشی از استافیلوکوکوس اپیدرمیس است. خیلی از کارتیبه‌هایی که از نظر کلینیکی طبیعی هستند میزان زیادی از عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی را نشان می‌دهند. استافیلوکوکوس سیمونس ایجاد ورم پستان غیرکلینیکی می‌کند. استافیلوکوکوس زایلوزوس باعث افزایش زودگذر در شمارش سلول سوماتیک می‌شود [۶۱].

## - عامل بیماری:

عامل معمول این بیماری استافیلوکوکوس / اورئوس همولیتیک کوآگولاز مثبت است، البته استافیلوکوکوس‌های کوآگولاز منفی دلیل عمده ورم پستان غیرکلینیکی در گوسفند می‌باشند. خصوصیات کشت، خواص بیوشیمیایی، شکل و خصوصیات رنگ‌پذیری استافیلوکوکوس‌ها در آخر همین فصل بیان می‌شود.

## - دام‌های حساس:

استافیلوکوکوس / اورئوس در گاو، گوسفند، بز و خوک ایجاد ورم پستان می‌کند [۶۱].

## - انتقال:

در این نوع ورم پستان عمده‌ترین منشا عفونت کارتیبه‌هایی هستند که با این میکروب آلوده گردیده‌اند و به وسیله انتقال با دست افراد یا ماشین شیردوشی آلوده شده‌اند، اگرچه استافیلوکوکوس‌ها می‌توانند در سطح پوست رشد نمایند و منبع عفونتی برای پستان باشند.